云 南 植 物 研 究 2003，25（4）：483～490
Acta Botanica Yunnanica

韭不同倍性及其非整倍体的 ITS 序列变异研究*

戴 波[1]，顾红雅[3]，瞿礼嘉[3]，虞 泓[2**]

（1 云南大学发展研究院，云南 昆明 650091；2 云南大学生命科学学院生态遗传学实验室，云南 昆明 650091；3 北京大学蛋白质工程和植物基因工程国家重点实验室，北京 100871）

摘要：对不同倍性及其非整倍体韭 *Allium tuberosum* 和野韭 *Allium ramosum* 核糖体 DNA 的内部转录区（ITS）进行了 PCR 扩增和克隆，并测定 10 个 ITS1 和 ITS2 的序列，用 ITS1 + ITS2 的序列探讨 *Allium tuberosum* 和 *Allium ramosum* 的系统发育关系。研究表明，*Allium tuberosum* 与 *Allium ramosum* 种间的平均 Kimura 遗传距离仅为 0.0146，二者是一对近缘种。虽然韭经历了长期的人工选择和自然选择，但与野韭的分化仍然较小。韭不同倍性及其非整倍体之间，其 ITS 序列亦无明显差异。

关键词：韭；野韭；ITS 序列；多倍体；非整倍体

中图分类号：Q 75　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0253－2700（2003）04－0483－08

Studies on Variation of ITS Sequences with Different Ploidy and Its Aneuploid in *Allium tuberosum*

DAI Bo[1]，GU Hong-Ya[3]，QU Li-Jia[3]，YU Hong[2]

（1 *School of Development Studies*，*Yunnan University*，Kunming 650091，China；2 *Laboratory of Ecogenetics*，*College of Life Science*，*Yunnan University*，Kunming 650091，China；3 *The National Laboratory of Protein Engineering and Plant Genetic Engineering*，*Peking University*，Beijing 100871，China）

Abstract：The ITS regions of 2 closely related species *Allium tuberosum* Rottler. ex Spreng. and *Alllium ramosum* L. in *Allium* Sect. *Rhiziridium* G. Don were amplified，cloned and sequenced. The genetic relationships among 10 materials of diploid，triploid，tetraploid and aneuploid in *Allium tuberosum* and *Allium ramosum* were reconstructed based on ITS1 + ITS2 sequences. The results demonstrated that the average Kimura pairwise distance between *Allium tuberosum* and *Allium ramosum* was 0.0146. They are a pair of closely related species. Although it was gone through evolution by artificial selection and natural selection，*Allium tuberosum* kept little differentiation from *Allium ramosum*. Sequences of ITS region show that there are no evident differentiation among the various diploid，triploid，tetraploid and aneuploid of *Allium tuberosum*.

Key words：*Allium tuberosum*；*Allium ramosum*；ITS sequence；Polyploidy；Aneuploid

---

* 基金项目：云南省“九五”科技攻关项目（95A－5）资助；云南大学植物学博士点基金资助；云南大学省级生物技术人才培养基地项目资助

** 通讯作者 Author for correspondence　E－mail：fisher@public. km. yn. cn

收稿日期：2002－09－13，2003－05－14 接受发表

作者简介：戴波（1964－）女，云南人，讲师，博士研究生，从事人类生态学研究。

韭 *Allium tuberosum* Rottler. ex Spreng. 隶属葱属 *Allium* 根茎组 Sect. *Rhiziridium* G. Don。一些学者应用形态学、细胞学等方法对该植物进行了研究（McCollum，1976；李懋学等，1982；黄瑞复等，1985；1990；1996），发现韭有二倍体、三倍体和四倍体，认为韭起源于野韭 *Alllium ramosum* L.。黄瑞复等（1990；1996）从自然三倍体的大量不稔种子中培育出二倍体（2n = 2x = 16）、三倍体（2n = 3x = 24）和四倍体（2n = 4x = 32），以及非整倍体（2n = 3x + 1 = 25，2n = 3x − 1 = 23，2n = 4x + 1 = 33 等）。根据外部形态特征观察发现各倍性之间存在差异。在许多植物类群中，人们已证明核糖体 DNA ITS（internal transcribed spacers）序列是一个可用来区别低级分类群的良好分子标记（molecular marker）（Baldwin 等，1995）。本文对 Sect. *Rhiziridium* G. Don 2 个近缘种的 ITS 区进行了 PCR 扩增，克隆并测定了 10 个 ITS1 和 ITS2 的序列，应用 ITS1 + ITS2 的序列分析了不同染色体倍性及其非整倍体韭的遗传关系。

韭广泛栽培，亦有野生。野生种生长于海拔 2 300 m 以下的草地、沟边、山坡或路旁（汪发缵和唐进，1980）。抗逆性强，栽培容易，又具有特异的辛香气味，自古以来就有栽培，早已成为人们喜爱的蔬菜品种。在全国各省、区广泛栽培。叶、花葶和花均做蔬菜食用；种子入药。韭有二倍体和四倍体，分别由野生二倍体韭和四倍体韭经长期驯化而来（McCollum，1976）。栽培的四倍体产量比二倍体高，故商品韭多为四倍体，二倍体已不多见。自然三倍体韭形态特征和四倍体韭很相似，主要差别是三倍体韭的植株稍矮小，高度不育（黄瑞复等，1985）。与其他三倍体植物一样，三倍体韭生长发育良好，生活力强，借助无性繁殖保持其三倍体特性。

虽然自然三倍体有性生殖减退，高度不育，但从大量不稔种子中可获得极少数能发芽的种子，黄瑞复教授等从这些种子中成功地培育出 40 多个株系，并做了它们的细胞遗传学研究，结果表明：整倍体约占 80%，有二倍体、三倍体和四倍体，三者出现的频率几乎相等；非整倍体约占 20%，有 2n = 4x + 1，2n = 3x + 1，2n = 3x − 1 等（黄瑞复等，1990）。研究中培养出来的各种株系，为韭的遗传育种提供了较好的育种材料。

1 材料和方法

1.1 实验材料

用于 DNA 提取的材料为植物新鲜或硅胶干燥叶片，TUB2 为种子发芽后长出的新叶片。来源见表 1。

表 1 实验材料的名称、缩写、染色体数及来源

Table 1 The names，abbreviation，location，chromosome number and origin of the materials

种名 Species	缩写 Abb.	产地 Location	染色体数 Chromosome number	来源 Source
A. ramosum	RAM	Shidu，Beijing（wild）	2n = 2x = 16	Dai Bo 9801
A. tuberosum	TUB1	Beijing（cultivar）	2n = 4x = 32	Dai Bo 9802
A. tuberosum	TUB2	Shanxi（cultivar）	2n = 2x = 16	Huang Rui-Fu 001
A. tuberosum	TUB3	Kunming（cultivar）	2n = 2x = 16	Huang Rui-Fu 02
A. tuberosum	TUB4	Kunming（cultivar）	2n = 3x = 24	Huang Rui-Fu 003
A. tuberosum	TUB5	Kunming（cultivar）	2n = 3x = 24	Huang Rui-Fu 004
A. tuberosum	TUB6	Kunming（cultivar）	2n = 3x + 1 = 25	Huang Rui-Fu 005
A. tuberosum	TUB7	Kunming（cultivar）	2n = 3x − 1 = 23	Huang Rui-Fu 006
A. tuberosum	TUB8	Kunming（cultivar）	2n = 4x = 32	Huang Rui-Fu 007
A. tuberosum	TUB9	Kunming（cultivar）	2n = 4x + 1 = 33	Huang Rui-Fu 008

1.2　实验方法

总 DNA 提取方法为 CTAB 法（Rogers & Bendich，1985）。

ITS1 的扩增引物（P1）为北京大学蛋白质工程和植物基因工程国家重点实验室自行设计。P1 距 18S rDNA 基因结束处 11 个碱基，其序列为 5′ – TCCGTAGGTGAAC CTGCGG – 3′；ITS2 的扩增引物（P4）参考 White 等（1990）根据真菌序列设计，P4 距 26S rDNA 基因起始处 37 – 44 个碱基，其序列为 5′ – TCCTC CGCTTATTGATATGC – 3′。

ITS 的扩增采取 P1 + P4 进行整段扩增。PCR 产物的纯化采用透析袋法，即将含有 PCR 产物的琼脂糖装在透析袋中，于电场中回收。

纯化的 PCR 产物与载体 T-easy vector 连接并转化。用 EcoR Ⅰ 和 HindⅢ 双酶切 Marker 鉴定，筛选出重组克隆。提取测序用质粒。

本实验采用自动测序法。使用 PE 公司 Dye-primer Cycle Sequencing Kit。从计算机中直接读取序列值。由于 ITS1 和 ITS2 区之间的 5.8S rDNA 十分保守，本实验对其不予考虑，只测定了位于 ITS 区两端的 ITS1 和 ITS2 的序列。

1.3　DNA 序列分析方法

DNA 序列的排序用 CLUSTAL Ⅴ 完成（Higgins 等，1992）；邻接树（neighbor-joining tree）根据 Kimura-2 参数遗传距离（Kimura-2 parameter genetic distance）用 MEGA 计算（Kumar 等，1993；Saitou & Nei，1987；Kimura，1981）；最大简约树（maximum parsimony tree）根据 PHYLIP 中的 DNAPARS（Felsenstein，1995）计算，最大似然树（maximum likelihood tree）根据 HKY 分子替代模型用 PUZZLE 4.0 计算（Strimmer & Haeseler，1997；Hasegawa 等，1985）。*Allium ramosum* 与 *Allium tuberosum* 关系十分密切，在分支分析中，选该种为外类群进行计算并比较。由于 ITS1 和 ITS2 的变异都较小，因此分支分析时把 ITS1 和 ITS2 结合在一起计算。

2　结果与讨论

2.1　ITS1 和 ITS2 区的全部克隆序列

测定的 10 个克隆 ITS 区的 ITS1 和 ITS2 序列见图 1。

```
ITS REGION     ITS1  1-248       ITS2  249-501

        0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000
        0000000001111111111222222222233333333334444444444555555555566666666667
        1234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890
RAM     TAGAGTCCCACTTTGAAAGATTGAGAACTTGTACCTATACCCATCGAGAACAAGGCAGTAATGCTATAAA
TUB1    ......................................................................
TUB2    .........................................T............................
TUB3    ................................................T.....................
TUB4    .............C................................T................T......
TUB5    ......................................................................
TUB6    ......................................................................
TUB7    ......................................................................
TUB8    ......................................................................
TUB9    ......................................................................

        0000000000000000000000000000011111111111111111111111111111111111111111
        7777777778888888888999999999900000000001111111111222222222233333333334
        1234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890
RAM     TATTGTATTGTTTAGAAGGGTTTCCCTTTGCTACCTTCTTCTTGCTTCACTTGAAGCAAGAAGGAGAGTA
TUB1    ..C...................................................................
TUB2    ..C...................................................................
TUB3    ......................................................................
TUB4    ..C...................................................................
```

```
TUB5    ......................................................................
TUB6    ......................................................................
TUB7    ..C...................................................................
TUB8    ..C...................................................................
TUB9    ......................................................................

        11111111111111111111111111111111111111111111111111111111111222222222222
        44444444455555555556666666666777777777788888888889999999999000000000011
        1234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890
RAM     GAAATAAGATATCGGCTCGGCTTGTGCCAAGGACAGCTGTTGTTGGAGTGCACTGTCGTCTTTT-TGGAT
TUB1    ................A..............................................A..T...
TUB2    ................A..............................................A..T...
TUB3    ................A..............................................A..T...
TUB4    ................A..............................................A..T...
TUB5    ................A..............................................A..T...
TUB6    ................A..............................................A..T...
TUB7    ................A..............................................A..T...
TUB8    ................A.........................................A....AG.T...
TUB9    ................A..............................................A..T...

        2222222222222222222222222222222222222222222222222222222222222222222222
        1111111112222222222333333333344444444445555555555666666666677777777778
        1234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890
RAM     GTGTAGTGTGCA-TTTTTACAAGCGTGACGT-CTG-AACACACGTCATTCTAAAC-ATCC-ATC-TA-TC
TUB1    ...C...........................G............................C.........
TUB2    ...C...........................CT--G...................C.AT.C...C..C..
TUB3    ...C...........................CT.....................................
TUB4    ...C........................GC..............C.........................
TUB5    ...C...........................C..................................T.A.
TUB6    ...C..................................................................
TUB7    ...C...........................C.........................G............
TUB8    ...C........G.................GA..G...................................
TUB9    ...C...........................C......................................

        2222222222222222222333333333333333333333333333333333333333333333333333
        8888888889999999999000000000011111111112222222222333333333344444444445
        1234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890
RAM     C-TAAAATA-TAGGCTTGGT-AGT-AATGGA-TATGGAGATTGACCTTCCGTGCTTTTGAGGTGCGGTTG
TUB1    ......................................................................
TUB2    .T.......A....A.....T...TA.....C......................................
TUB3    .C....................................................................
TUB4    ....................T.................................................
TUB5    ......................................................................
TUB6    ......................................................................
TUB7    ...............................................................C......
TUB8    ......................................................................
TUB9    ......................................................................

        3333333333333333333333333333333333333333333333333444444444444444444444
        5555555556666666666777777777788888888889999999999000000000011111111112
        1234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890
RAM     GTTTAA-GTGATGGTTGTTGCTAGGTTTGCACGTGGAGAATGGTGTATCGAGGTGTAACACGCGATCTCT
```

```
TUB1    .....................................................--...............
TUB2    ......A..............................................--...............
TUB3    .....................................................--...............
TUB4    .........A...........................................--...............
TUB5    .....................................................--...............
TUB6    .....................................................--...............
TUB7    .....................................................--...............
TUB8    .....................................................--...............
TUB9    .....................................................--...............

        4444444444444444444444444444444444444444444444444444444444444444444444
        2222222222333333333344444444445555555555666666666677777777778888888889
        1234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890
RAM     AACTGCGTACAAGAGTCCTAGCAACGATTT-ACAGTAATAGAAACCAATGTCGTTGTTTGCACTATTTGC
TUB1    ......................................................................
TUB2    ..............................C...................................C...
TUB3    ......................................................................
TUB4    ......................................................................
TUB5    ..-...................................................................
TUB6    ......................................................................
TUB7    ........................................A.............................
TUB8    ......................................................................
TUB9    ..-...................................................................

        44444444455555555555
        99999999900000000001
        12345678901234567890
RAM     AAGAATGGACC
TUB1    ...........
TUB2    ...........
TUB3    ...........
TUB4    ...........
TUB5    ...........
TUB6    ...........
TUB7    ...........
TUB8    ...........
TUB9    ...........
```

图 1　ITS1 和 ITS2 的核苷酸排列顺序

Fig. 1　The alignment of ITS1 and ITS2 sequences

每行序列之前的字母和数字是实验材料的缩写（表 1），“ . ”代表与第一行相同的碱基，“ – ”代表缺失。

The alphabets and number ahead every row are abbreviation of sample materials (seen Tab. 1), “ . ”indicates the same base as the first row, “ - ” indicates a gap.

2.2 ITS1 和 ITS2 的 长度变异和 G+C 含量

从图 1 中可看出不同材料韭的 ITS1 和 ITS2 长度有变异，ITS1 长度变异范围为 244－248bp，部分序列在第二百四十三位点和第二百四十七位点有 1bp 的插入（insert），一个序列在第二百四十五位点有 2bp 的缺失；ITS2 长度变异范围为 240－251bp，两个序列在第三百零一位点有 1bp 的插入，两个序列在第四百二十三位点有 1bp 的缺失（deletion），九个序列在第四百零四位点有 2bp 的缺失；TUB8 和 TUB2 在多个位点有 1bp 的插入，与其它韭相比较变异较大。这一结果与大多数已知的 *Allium* 属的 ITS 长度相近（Dubouzet & Shinoda，1998），与多星韭 *Allium wallichii* Kunth 复合体（该测序结果将在另一文中发表列出，其 ITS1 长 242－244bp，ITS2 长 245－247bp）较为接近。ITS1+ITS2 全长 501bp，共有 46 个变异位点，占全长的 9.18%，其中，简约位点（或称信息位点）9 个，占变异位点的 19.57%，仅占全长的 1.8%。韭的 ITS1 和 ITS2 区变异位点的分布不均匀，有些区域变化稍多，有些区域几乎没有变化。

ITS1+ITS2 的碱基含量总的各为：A=27.0%，C=18.2%，G=24.2%，T=30.7%。表 2 和表 3 分别为 ITS1 和 ITS2 碱基数及 G+C 含量。从表中看出 ITS1 的 G+C 含量略低于 ITS2。

表 2 各材料 ITS1 和 ITS2 的长度和 G+C%组成

Table 2 Length of ITS1 and ITS2 and G+C%

ITS1 248bp average G+C%：41.76%

ITS2 253bp average G+C%：42.41%

SAMPLE	TOTAL ITS1	G/C% ITS1	TOTAL ITS2	G/C% ITS2
RAM	244	41.8	242	42.5
TUB1	245	42.4	243	42.3
TUB2	244	41.8	251	42.6
TUB3	245	42.0	241	42.7
TUB4	245	42.0	242	42.1
YUB5	245	41.6	241	42.3
TUB6	244	41.8	240	42.5
TUB7	245	42.4	242	42.1
TUB8	248	43.1	242	42.1
TUB9	245	42.0	241	41.9

2.3 Kimura 进化距离

根据 Kimura-2 参数遗传距离模型计算得到的序列间遗传距离见表 3。不同倍性及其非整倍体韭与野韭之间 ITS1+ITS2 的距离在 0－0.0252 之间，平均距离为 0.0146。野韭与二倍体韭之间的平均距离为 0.0178，野韭与三倍体韭之间的平均距离为 0.0189，野韭与四倍体韭之间的平均距离为 0.0125。二倍体韭与三倍体韭之间的平均距离为 0.0183，二倍体韭与四倍体韭之间的平均距离为 0.0104，三倍体韭与四倍体韭之间的平均距离为 0.0136。这一结果表明野韭与韭之间分化较小；韭整倍体之间，或是韭整倍体与非整倍体之间，其分化也较小。

表 3 10 个 ITS 序列间的 Kimura 进化距离

Table 3 Pairwise divergence of 10 ITS sequences using Kimura 2-parameter distance

Pop.	RAM	TUB1	TUB2	TUB3	TUB4	TUB5	TUB6	TUB7	TUB8	TUB9
RAM		0.0104	0.0210	0.0146	0.0252	0.0125	0.0083	0.0167	0.0146	0.0083
TUB1	0.0047		0.0104	0.0062	0.0146	0.0083	0.0021	0.0083	0.0062	0.0041
TUB2	0.0067	0.0047		0.0167	0.0252	0.0168	0.0125	0.0146	0.0146	0.0125
TUB3	0.0055	0.0036	0.0059		0.0188	0.0125	0.0062	0.0104	0.0104	0.0062
TUB4	0.0073	0.0055	0.0073	0.0063		0.0210	0.0167	0.0210	0.0188	0.0168
TUB5	0.0051	0.0042	0.0059	0.0051	0.0067		0.0042	0.0146	0.0125	0.0062
TUB6	0.0042	0.0021	0.0051	0.0036	0.0059	0.0029		0.0083	0.0062	0.0000
TUB7	0.0059	0.0042	0.0056	0.0047	0.0067	0.0055	0.0042		0.0125	0.0083
TUB8	0.0055	0.0036	0.0055	0.0047	0.0063	0.0051	0.0036	0.0051		0.0083
TUB9	0.0042	0.0029	0.0051	0.0036	0.0060	0.0036	0.0000	0.0042	0.0042	

（上右是距离值，下左是标准差值）Distances in the upper-right matrix. Standard Errors in lower-left matrix

2.4　依据 ITS 序列构建系统发育树

最大似然树（ML Tree，图 2）是用 Puzzle 4.0 软件计算，碱基替换模型用 HKY 模型（Hasegawa *et al*，1985），其中转换/颠换比值为 1.54，嘧啶型转换/嘌呤型转换比值为 1.12，碱基频率从数据本身估算，A = 21.9%，C = 20.6%，G = 26.3%，T = 31.2%。

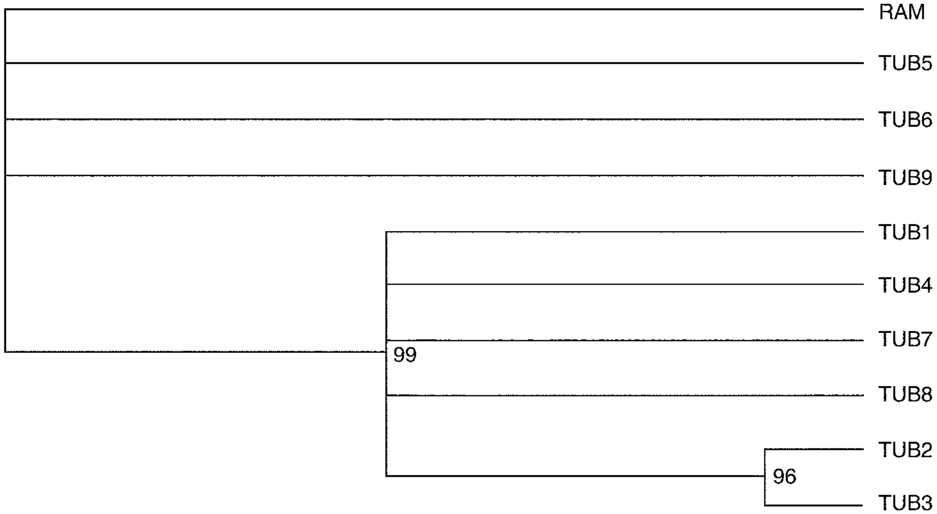

图 2　最大似然树（ML Tree）。用 Puzzle 4.0 完成。分支上面的数字是 1000 次 quartet puzzling 分析所得的百分比；log L = －1925.06（不用分子钟）。

Fig. 2　The maximum likelihood tree based on 10 ITS1 and ITS2 sequences using PUZZLE 4.0（Strimmer and Haeseler 1997）according to HKY model. Number on branches are values（%）of 1000 quartet puzzling searches. log L is －1925.06（without clock）.

根据 ITS1 + ITS2 序列重建的简约树 和邻接树与 最大似然树基本一致（ML 图 2），我们选择了与 *A. tuberosum* 关系较近的 *A. ramosum* 作为外类群 ，三者拥有相同的拓扑结构。分析表明，*A. tuberosum* 和 *A. ramosum* 是一对近缘种；并且两者间其 ITS 序列分化仍然较小；*A. tuberosum* 不同倍性及其非整倍体之间，其 ITS 序列亦无明显分化。

3　结论

根据 ITS 序列分析，韭和野韭是一对近缘种；虽然韭经历了长期的自然选择和人工选择，但与野韭仍然无明显分化。韭不同倍性及其非整倍体之间，其 ITS 序列亦无明显分化。该结果与形态特征和细胞染色体研究基本一致（李懋学等，1982；黄瑞复等，1985；1990；1996），即野韭与二倍体栽培韭，不仅形态相似，而且核型也相似。从植株大小形态上看，韭的四倍体大于三倍体，三倍体大于二倍体，也就是四倍体植株相对粗壮高大，三倍体植株比四倍体植株矮，叶片较短较窄，但叶质肥厚柔嫩，发棵较多，产量上三倍体韭不如四倍体韭，二倍体植株普遍纤细矮小（晏一祥，1986）。除了植株大小有差异，二倍体、三倍体和四倍体韭形态特征和核型均基本相似（黄瑞复等，1982；黄瑞复等，1985）。

在葱属植物中，ITS 区并未明显分化。韭和野韭为多年生草本植物，兼有性生殖（种

子）和无性生殖（根状茎）同时存在，生活史较木本类植物短，这两个近缘种中 ITS 序列的变异不会发生较大变化，因而上述基因树在一定程度上能反映相互间的系统发育关系。

〔参 考 文 献〕

汪发缵，唐进，1980. 中国植物志第 14 卷 [M]. 北京：科学出版社，210—213

黄瑞复，魏蓉城，晏一祥，1990. 韭的细胞遗传学研究 [A]. 见：中国遗传学会编，研究中国遗传学研究 [M]. 北京：中国科技出版社，84—85

Baldwin BG，Sanderson JM，Wojciechowski MF，*et al*，1995. The ITS region of nuclear ribosomal DNA：A valuable source of evidence on angiosperm phylogeny [R].

Dubouzet JG，Shinoda K，1998. Phylogeny of *Alllium* L. Subg. Melanocrommyum（Webb et Berth.）Rouy based on DNA sequence analysis of the internal transcribed spacer region of nrDNA [R]. Theor. Appl. Genet

Felsenstein J，1995. *PHYLIP*（Phylogeny Inference Package）version 3.57c [R]. Department of Genetics，University of Washington，Seattle，WA 98195，USA

Hasegawa M，Kishino H，Yano K，1985. Dating of the human-ape splitting by a B-Genome Progenitor of wheat（*Triticum aestivum*）[J]. *Genome*，**39**：543—548

Higgins DG，Bleasby AJ，Fuchs R，1992. CLUSTAL V：improved software for multiple sequence alignment [J]. *CABIOS*，**8**：189—191

Huang RF（黄瑞复），Wei RC（魏蓉城），Yan YX（晏一祥），1985. Discovery of Spontaneous Triploid of *Allium tuberosum* [J]. *J Wuhan Bot Res*（武汉植物学研究），**3**（4）：429—431

Huang RF（黄瑞复），Yu H（虞泓），1996. Study on euploid variation in offspring of nature triploid in *Allium tuberosum*（*Liliaceae*）[J]. *Acta Bot Yunnan*（云南植物研究），Supp. Ⅷ：85—90

Li MX（李懋学），Shang ST（商树田），Wang ZX（王志学），1982. An investigation on the Karytype of *Allium tuberosum* Rottler and *A. ramosum* L. [J]. *Acta Hort Sin*（园艺学报），**9**（3）：31—36

Kimura M，1981. Estimation of evolutionary distances between homologous nucleotide sequence [J]. *J Mol Evol*，**16**：111—120

Kumar S，Tamura K，Nei M，1993. MEGA：molecular evolutionary genetic analysis，version 1.01 [R]. *Institute of Molecular Evolutionary Genetics*，Pennsylvania State University，University Park PA，16802，USA

McCollum GD，1976. Onion and Allies [A]. In Simmonds NW eds，Evolution of Crop Plants [M]. London and New York：Longman，186—190

Rogers SO，Bendich AJ，1985. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh，diversity，herbarium and mummified plant tissues [J]. *Plant Mol Biol*，**5**：69—76

Saitou N，Nei M，1987. The neighbor-joining method：a new method for reconstructing phylogenetic tree [J]. *Mol Biol Evol*，**4**：406—425

Strimmer K，Haeseler A，1997. *PUZZLE*（Maximum likelihood analysis for nucleotide，amino-acid，and two-state data）Version 4.0 [R]. M N Zoologisches Institut，University，Mnchen，Germany

White TJ，Lee S，Taylor J，1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics [A]. In Innis MA，Gelfand DH，Sninsky JJ，*et al*，eds. Edited by PCR protocls：A Guide to Methods and Applications [M]. San Diego：Academic Press，315—322

Yan YX（晏一祥），1986. The karyotype，meiotic characteristics and potential value in cultivation of a triploid of *Allium tuberosum* [J]. *J Yunnan Univ*（云南大学学报），**8**（4）：422—426